

PatV



Anais da 49ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Zootecnia
A produção animal no mundo em transformação



Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012

Avanços na produção de animais transgênicos e suas aplicações para a sociedade

Luiz Sergio de Almeida Camargo¹, Michele Munk Pereira, Lilian Tamy Iguma,
Humberto Melo Brandão, João Henrique Moreira Viana

Resumo: A transgenia mostrou-se uma ferramenta poderosa na geração de novos cultivares e tem contribuído para aumentar a produção agrícola. Na pecuária, contudo, sua aplicação comercial é ainda insipiente, em parte devido as dificuldades na produção em larga escala de animais transgênicos, e em parte pelas dúvidas quanto à aceitação do mercado quanto a alimentos de origem de animais geneticamente modificados. A transgenia em animais também pode ser utilizada vislumbrando a produção de biofármacos, para os quais a aceitação pelo consumidor é maior e cuja demanda pode ser alcançada com poucos animais transgênicos, ou seja, pelo uso da técnica em menor escala. Diversos animais transgênicos com potencial de contribuir para aumentar a produção e a qualidade de alimentos já foram gerados, ainda que em escala reduzida, e servem como modelo de estudo sobre os potenciais impactos da transgenia sobre a pecuária. Como os procedimentos atuais para a produção de animais transgênicos são poucos eficientes, esforços têm sido realizados para sua otimização ou para o desenvolvimento de estratégias alternativas. Paralelamente, é necessário atender as exigências de biossegurança tanto para a produção como para o consumo do alimento gerado pelos animais transgênicos. Essa revisão propõe apresentar alguns modelos de animais transgênicos que podem ser úteis para a pecuária e alternativas para se produzir embriões geneticamente modificados.

Palavras-chave: animais geneticamente modificados, embriões, transgenia

¹ Embrapa Gado de Leite. Rua Eugenio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG. 36038-330
e-mail: camargo@cnppl.embrapa.br



Advances in transgenic animal production and its application to the society

Abstract: Transgenesis is a powerful tool to generate news cultivars and has contributed to increase the crop production. In livestock, however, its commercial application is still null, part due to the difficulty to produce transgenic animals in large scale and part to the doubts regarding the market acceptance of food from genetically modified animals. Animal transgenesis can also be used to produce recombinant drugs, which acceptance by the society is greater, and their demand can be achieved with few transgenic animals. Several transgenic animals with capacity to contribute to increase food quantity and quality have been already generated, despite in small scale, and can be useful as a model to study the potential impacts of transgenesis on livestock production. As the current procedures to produce transgenic animals have low efficiency, efforts have been carried out to optimize or to develop alternatives strategies to them. Concomitantly, it is important to follow the biosecurity requirements not only for production but also for consumption of food from transgenic animals. This review aims to present some models of transgenic animals that can be useful for livestock production and alternatives to generate genetically modified embryos.

Key words: genetically modified animals, embryos, transgenesis.



Introdução

A transgenia tem sido, desde a década de 80, uma ferramenta importante para incrementar o conhecimento dos mecanismos de desenvolvimento e de regulação gênica. Em vegetais, o uso desta tecnologia tem sido adotado por diversos países para a produção de grãos, como Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e África do Sul. Como exemplo, a produção mundial de soja transgênica em 2009 representou 77% do total plantado, a de algodão representou 49%, e a de milho 26% (GMO Compass, 2010).

Em animais de produção, a transgenia ainda não alcançou o mesmo sucesso, em parte pela dificuldade e pelo alto custo de se produzir animais transgênicos em escala, e em parte pelas dúvidas quanto a aceitação no mercado de um alimento originado de um animal geneticamente modificado. Por outro lado, a geração de animais transgênicos como biofábricas para produção de biofármacos tem recebido mais atenção, devido à grande demanda por esses produtos e a possibilidade de produção de maiores quantidades dos mesmos por alguns poucos animais transgênicos. Em uma simulação, Wall et al. (1997) estimaram que, para atender a demanda americana pelo fator IX de coagulação sanguínea à época, seria necessário somente um bovino ou sete caprinos transgênicos. Existem vários exemplos de animais transgênicos produzindo, via glândula mamária, biofármacos que podem vir a ser utilizados na saúde humana, como o hormônio do crescimento humano (Salamone et al., 2006) e o fator estimulante de colônias de granulócitos humano (Freitas et al., 2007). A antitrombina recombinante humana é exemplo de biofármaco aprovado na Europa e Estados Unidos para uso em



situações específicas na saúde humana, com previsão de atingir vendas de até US\$10 milhões de dólares (Kling, 2009).

Em relação à pecuária, existe a expectativa de que a transgenia possa contribuir para melhorar a produção de alimentos de origem animal. A transgenia pode gerar animais resistentes a doenças, com maior taxa de crescimento ou melhor composição da carne e do leite (Houdebine, 2005, Kues & Niemann, 2011). Contudo, além da complexidade de expressão de muitas das características produtivas e dos cuidados com biossegurança, a geração de animais transgênicos em escala esbarra na baixa eficiência das técnicas disponíveis para se produzir embriões e, conseqüentemente, animais nascidos transgênicos. Essa revisão tem o objetivo de apresentar modelos de animais transgênicos que podem ser úteis para a pecuária e os avanços para se produzir embriões geneticamente modificados.

Transgenia na produção de alimentos de origem animal

A idéia de usar a transgenia para se gerar animais domésticos vem desde a década de 80 (Hammer et al., 1985, Pursel et al., 1989) quando foram obtidos suínos transgênicos pelo método de microinjeção pronuclear, porém a possibilidade de se gerar rebanhos de animais de produção transgênicos de modo mais eficiente se tornou mais real a partir de 1997, com o advento da transferência nuclear com célula somáticas (TNCS). Atualmente, animais transgênicos de diversas espécies foram gerados (Kues e Niemann, 2011). A seguir serão apresentados alguns exemplos de animais transgênicos e suas implicações na produção de alimentos de origem animal.

A composição do leite tem grande importância para a indústria de laticínios. O aumento na quantidade de proteína aumenta o rendimento na produção de derivados e



esta tem sido usada como parâmetro para bonificação ao produtor. Portanto, um animal produzindo maiores quantidades de proteína seria útil para o produtor e para a indústria de laticínios. Pesquisadores neozelandeses geraram bovinos clones transgênicos que produzem maiores quantidade de beta e kapa caseína bovina no leite, introduzindo cópias adicionais dos genes que codificam essas proteínas, e conseguiram obter um aumento entre 17 e 35% na quantidade total de caseína no leite (Brophy et al., 2003). Posteriormente, estes autores verificaram que a composição geral do leite desses animais foi semelhante ao dos animais controles, mas com coloração mais amarela, e seu processamento resultou em queijo com menos gordura, mais sólidos e pequenas mudanças no perfil de aminoácidos (Laible et al., 2007).

Lisozima é uma enzima presente naturalmente no leite e que tem a ação de quebrar componentes da parede celular de bactérias, atuando como um agente protetor para o úbere (Grün, 1985). Sua propriedade antimicrobiana pode ser útil para reduzir o risco de mastites e de aumentar o tempo de prateleira do leite. Além disso, o leite com este antimicrobiano natural humano poderia ser utilizado para alimentação de crianças com problemas gastrointestinais. Cabras transgênicas com o gene da lisozima humana foram geradas e encontrou-se uma menor contagem de células somáticas, provavelmente associada a uma melhor saúde intramamária (Maga et al., 2006b). Os autores verificaram que o leite com lisozima humana de cabras transgênicas reduziu o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* (Maga et al., 2006a), mas não teve efeito sobre bactérias usadas para fabricação de queijos (Scharfen et al., 2007).

Um dos agentes responsáveis pela maior parte das mastites clínicas e subclínicas é a bactéria *S. aureus* (Sá et al., 2004). Animais resistentes a infecções intramamária por *S. aureus* seriam de grande valor para o produtor, reduzindo uso de antibióticos e o



descarte do leite durante o período de carência exigido após aplicação do antibiótico. A enzima lisostafina produzida pela bactéria *Staphylococcus simulans* tem a função de hidrolisar especificamente a parede celular da *S. aureus* (Kumar, 2008) e o seu uso como tratamento de mastite pode resultar em porcentagem de cura similar a de alguns antibióticos, com a vantagem de não ter os problemas associados ao descarte do leite decorrente do uso de antibióticos. Seu uso recorrente, contudo, poderia causar reações imunológicas (Gruet et al., 2001). Uma alternativa seria produzir bovinos transgênicos com o gene de lisostafina. Em 2005, Wall et al. (2005) relataram que vacas transgênicas com o gene da lisostafina secretavam a enzima por toda a lactação, sem alterar a produção de leite e, quando desafiadas com infusão intramamária de *S. aureus*, não apresentaram alteração da contagem de células somática e da temperatura corpórea, ao contrário das vacas controles. O processamento do leite pela pasteurização e a manufatura do queijo não eliminou, mas reduziu a quantidade e atividade da lisostafina, assim como não houve interferência na coagulação do leite ou atividade das bactérias responsáveis pela fabricação de queijos (Van Hekken et al., 2009).

A peste suína clássica (PSC) é uma doença viral contagiosa que causa grandes danos a suinocultura. A presença da PSC tem sido recorrentemente relatada na Europa, Ásia e Oriente Médio. Em 1997 a Dinamarca foi afetada por um surto de PSC, quando mais 12 milhões de suínos domésticos foram abatidos (Stegeman et al., 2000). Em 2009, após 62 anos sem casos, a PSC ressurgiu em Israel quando 72% dos animais dos rebanhos afetados foram mortos (David et al., 2009). Neste mesmo ano, algumas regiões da Alemanha tiveram um surto de PSC em suínos selvagens (Leifer et al., 2010). Na Índia, 63,3% das amostras sanguíneas analisadas entre 2004 e 2010 possuíam anticorpos contra PSC (Nandi et al., 2011). Nessas regiões, surtos da PSV são



vinculados a presença do vírus nos suínos selvagens. Uma das medidas adotadas pela Comunidade Européia para controle e erradicação da PSC é a vacinação de animais selvagens em casos de surtos. Já em regiões endêmicas, a inclusão da vacinação dos rebanhos domésticos é um dos métodos mais efetivos para o controle da doença; contudo, a diferenciação entre animais afetados pela doença e animais vacinados é necessária para que aqueles que forem vacinados possam ser comercializados (Greiser-Wilke & Moenning, 2004). A vacina comumente utilizada é derivada de cepa viral chinesa (C-strain) atenuada e, apesar de sua eficiência, não permite diferenciar os animais vacinados dos infectados, ao contrario de vacinas recombinantes contendo antígenos específicas do vírus. Duas vacinas recombinantes comerciais contendo o antígeno E2, uma glicoproteína do envelope viral, foram desenvolvidas a partir da expressão de baculovirus em células de insetos e permitem o diagnóstico diferencial por meio de testes de ELISA (Greiser-Wilke & Moenning, 2004, Dong & Chen, 2007, Greiser-Wilke et al., 2007). Essas vacinas recombinantes podem também ser produzidas por animais transgênicos, aumentando a capacidade de produção e reduzindo o custo. Cabras cujas glândulas mamárias sofreram transdução por vetores adenovirais contendo o gene da glicoproteína E2 viral foram capazes de produzir o antígeno no leite, o que resultou em proteção contra a PSC (Toledo et al., 2008). A vacina recombinante alcançou uma resposta protetora por pelo menos nove meses após a vacinação (Barrera et al., 2010). Tais cabras tiveram somente as células da glândula mamária geneticamente modificadas, o que pode limitar a duração da produção da glicoproteína, mas animais inteiramente geneticamente modificados podem ser gerados visando a produção contínua do antígeno durante a vida do animal e nas gerações seguintes.



Alternativas para a produção de animais transgênicos

Existem diversos métodos para se produzir um animal transgênico. O método mais conhecido é a microinjeção pronuclear de DNA, comum em roedores nos quais o pronúcleo é visível. Em animais de produção, como bovinos, suínos e caprinos, este método também é utilizado e foi responsável pelo nascimento de animais transgênicos (Maga et al., 2006b, Freitas et al., 2007), mas possui o inconveniente de ser necessária uma centrifugação para visualização do pronúcleo, o que contribui para redução da viabilidade dos embriões. Além disso, esta técnica gera alto grau de mosaicismos, com baixa capacidade de transmissão entre gerações, e eficiência entre 5 e 10% de animais transgênicos nascidos (Eyestone, 1999, Wall, 2001). Com o advento da TNCS, vislumbrou-se a possibilidade de se transfectar células somáticas e cultivá-las por períodos maiores até ser possível certificar-se que o transgene efetivamente está integrado no genoma antes de usá-las como doadoras de núcleo para a reconstrução de embriões clones. Dessa maneira, o embrião reconstruído teria em seu genoma, de forma assegurada, o transgene, resultando em nascimentos somente de animais transgênicos e que podem transmitir o transgene para seus descendentes. De fato, após a publicação do nascimento da Dolly (Wilmut et al., 1997), diversos estudos relataram o nascimento de animais transgênicos via TNCS (Cibelli et al., 1998, Arat et al., 2002). Para o sucesso da TCNS, o núcleo da célula doadora necessita passar por uma reprogramação nuclear para assumir o padrão de expressão de um embrião (Jouneau & Renard, 2003, Latham, 2005). Falhas nessa reprogramação pode estar associada a menor viabilidade dos embriões, das gestações e dos animais nascidos. De fato, a TNCS por si causa altas taxas de perdas gestacionais e mortes após o nascimento, resultando em eficiência abaixo de 10% de animais vivos após as primeiras semanas do nascimento (Powell et



al., 2004; Camargo et al. 2011, Sangalli et al., 2012), o que mostra que estudos para se entender as mudanças moleculares e celulares envolvidas na TNCS ainda são necessários para se otimizar a técnica. Ou seja, no momento atual a TCNS é pouca viável para se produzir animais transgênicos em escala.

Ao final da década de 80 foi publicado um estudo em camundongos com o uso de espermatozoides como vetor para o transporte do transgene para um oócito durante a fecundação (Lavitrano et al., 1989), caracterizando a técnica conhecida como transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME). Esse mesmo grupo relatou a produção de porcos transgênicos por meio de inseminação artificial com sêmen contendo o gene regulador da ativação de complemento humano (Lavitrano et al., 1997). A TGME se vale da interação das células espermáticas com o DNA exógeno e a capacidade do espermatozoide em internalizar este DNA (Spadafora, 2007) e apresenta-se como um método de baixo custo e que pode ser usado em larga escala. Contudo, apesar do sucesso da técnica em alguns laboratórios, sua reprodutibilidade é inconsistente, com alto grau de mosaicismos, sendo difícil a previsão da eficiência em gerar animais transgênicos (Spadafora, 2008, Galli et al., 2012), pois nem sempre ocorre a integração do transgene no genoma do embrião recém-formado. Além disso, pode haver diferenças entre raças quanto à capacidade do espermatozoide em interagir com o DNA (Zhao et al., 2012), o que pode estar relacionado a baixa reprodutibilidade. A associação da TGME com a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) pode ser usada para se aumentar a eficiência da integração e a redução do grau de mosaicismos, como observado recentemente em suínos (Umeyama et al., 2012). Em ovinos, a ICSI associada à TGME se mostrou mais eficiente para se produzir embriões transgênicos quando comparado com a inseminação laparoscópica e fecundação *in vitro* (Pereyra-



Bonnet et al., 2011). O aprimoramento dos procedimentos para o uso da TGME deve melhorar sua eficiência e previsibilidade, tornando a técnica uma opção para a produção em escala de animais transgênicos a custos menores.

Vetores lentivirais tem sido outra alternativa para se produzir animais transgênicos. Tais vetores possuem a vantagem de infectar uma ampla variedade de células em estágios diferentes da divisão celular, e geralmente resultam em integração estável do DNA exógeno no genoma (Singer & Verma, 2008). Estudos mostraram que é possível gerar embriões e animais nascidos transgênicos suínos e bovinos a partir da injeção dos vetores lentivirais no espaço perivitelino dos oócitos (Hofmann et al., 2003, Hofmann et al., 2004). Este último estudo alcançou a taxa de 83% de embriões bovinos produzidos pela fecundação *in vitro* a partir de oócitos maturados *in vitro* e injetados com vetores lentivirais contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP). Oito embriões positivos para GFP foram transferidos para receptoras, o que gerou quatro animais, todos expressando o gene GFP. Em outro estudo, Ewerling et al. (2006) relatou que 67% dos embriões gerados por fecundação *in vitro* a partir de oócitos maturados e injetados com vetores lentivirais expressaram o gene GFP; taxa superior àquela obtida pela injeção lentiviral assistida por laser (44%). Em nossas condições, 32% (8/25) dos blastocistos derivados de oócitos maturados e injetados com vetores lentivirais apresentaram-se expressando o GFP (Camargo, comunicação pessoal, 2012). Mais recente Lillico et al. (2011) relataram 61 nascimentos de 230 embriões transferidos, gerados com injeção de vetores lentivirais com diversos transgeneses, sendo que 32 dos animais nascidos eram transgênicos (taxa de 52% de animais transgênicos nascidos); valores esses superiores aos encontrados na literatura para os métodos TCNS e TGME. Contudo, os vetores lentivirais possuem alguns inconvenientes: não possuem



capacidade de carrear construções gênicas grandes, com tamanho limitado a uma dezena de quilobases; a integração é aleatória, o que pode levar a uma fraca atividade de expressão do transgene; e a possibilidade de múltiplas integrações, que pode causar mosaïcismo se ocorrerem após o estágio de zigoto (Whitelaw et al., 2008, Galli et al., 2012).

Nanopartículas são consideradas potenciais vetores de DNA para a transfecção de células eucariontes. Estudos mostraram que nanotubos de carbono funcionalizados podem atravessar a membrana de células humanas e murinas e serem usados para transfecção de pequenos RNAs de interferência (Krajcik et al., 2008; Ladeira et al., 2010). Nosso grupo mostrou que nanotubos de carbono (NTC) multicamadas podem ser usados também para transfecção de fibroblastos bovinos, processo que necessita ainda de otimização visando aumentar a eficiência (Pereira et al., 2012). Uma das barreiras para uso de métodos convencionais de transfecção, como lipossomos e polímeros catiônicos, em oócitos e embriões, é a zona pelúcida. Em estudo recente, mostramos que NTC podem atravessar a zona pelúcida de blastocistos (Pereira et al., 2010), abrindo novos caminhos para transfecção de oócitos e embriões.



Considerações finais

Otimização dos métodos disponíveis e surgimento de novas técnicas para gerar embriões transgênicos são necessários para que a transgenia possa ser aplicada de forma eficiente. A transgenia em animais de produção pode trazer benefícios para a sociedade, tanto para o produtor como para o consumidor, considerando-se a possibilidade de aumentar a eficiência na produção e a qualidade do alimento de origem animal, com menor prevalência de doenças e do uso de antibióticos. Contudo, a aceitação pelo mercado de produtos de animais geneticamente modificados depende de esforços da ciência em mostrar não somente a eficiência do processo, mas também a segurança na produção e no consumo destes alimentos. Além disso, os procedimentos para gerar animais transgênicos e as modificações gênicas realizadas devem também assegurar o bem-estar animal, evitando o sofrimento desnecessário.

Agradecimentos

À Rede Mineira de Biotecnologia para a Agropecuária/FAPEMIG e ao Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia/CNPq pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa.



Referências

- ARAT, S.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S.J. et al. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1768-1774, 2002.
- BARRERA, M.; SÁNCHEZ, O.; FARNÓS, O. et al. Early onset and long lasting protection in pigs provided by a classical swine fever E2-vaccine candidate produced in the milk of goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, p. 25-32. 2010.
- BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER T. et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nature Biotechnology**, v. 2, p. 157-162, 2003.
- CAMARGO, L.S.A.; QUINTÃO, C.C.R.; DENICOL, A.C. et al. Effect of trichostatin A on production of bovine embryos produced by somatic cell nuclear transfer and subsequent gestations. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 24, Cumbuco. **Anais...Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 2011. p. S442.
- CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.
- DAVID, D.; EDRI, N.; YAKOBSON, B.A. et al. Emergence of classical swine fever virus in Israel in 2009. **The Veterinary Journal**, v. 190, p.146-149, 2011.
- DONG, X.N.; CHEN, Y.H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. **Vaccine**, v. 25, p. 205-230, 2007.
- EWERLING, S.; HOFMANN, A.; KLOSE, R. et al. Evaluation of laser-assisted lentiviral transgenesis in bovine. **Transgenic Research**, v. 4, p. 447-454, 2006.
- EYESTONE WH. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology. **Theriogenology**, v.51, p. 509-517, 1999.
- FREITAS, V.J.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, p.585-592, 2007.
- GALLI, C.; LAGUTINA, I.; PEROTA A. Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 2-11, 2012.
- GMO Compass. Março de 2010. http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/. Acesso em 02/07/2012



GREISER-WILKE I, MOENNIG V. Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, p. 223-226, 2004.

GREISER-WILKE, I.; BLOME, S.; MOENNIG, V. Diagnostic methods for detection of classical swine fever virus-status quo and new developments. **Vaccine**, v. 25, p. 5524-5530, 2007.

GRÜN, E. The physiological and diagnostic importance of lysozyme in cow's milk. **Allergie und Immunologie**, v. 31, p. 3-15, 1985.

GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 245-259, 2001.

HAMMER, R.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E. Jr. et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680-683, 1985.

HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S. et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v.11, p. 1054-1060, 2003.

HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M. et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biology of Reproduction**, v.2, p. 405-409, 2004.

HOUDEBINE, L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. **Reproduction in Domestic Animals**, v.4, p. 269-281, 2005.

JOUNEAU, A.; RENARD, J.P. Reprogramming in nuclear transfer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 5, p. 486-491, 2003.

KLING, J. First US approval for transgenic drug. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 902-904, 2009.

KRAJCIK, R.; JUNG, A.; HIRSCH, A. et al. Functionalization of carbon nanotubes enables non-covalent binding and intracellular delivery of small interfering RNA for efficient knock-down of genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, p. 595-602, 2008.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 146-156, 2011.

KUMAR, J.K. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 4, p. 555-561, 2008.

LADEIRA, M.S.; ANDRADE, V.A.; GOMES, E.R. et al. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. **Nanotechnology**, v. 21, p. 385101, 2010.



- LAIBLE, G.; BROPHY, B.; KNIGHTON, D. et al. Compositional analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle. **Theriogenology**, v. 67, p. 166-177, 2007.
- LATHAM, K.E. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning. **Biology of the Cell**, v. 97, p. 119-132, 2005.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO V.M. et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell**, v.57, p. 717-723, 1989.
- LAVITRANO, M.; FORNI, M.; VARZI, V. et al. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. **Transplantation Proceedings**, v. 8, p. 3508-3509, 1997.
- LEIFER, I.; HOFFMANN, B.; HÖPER, D. et al. Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 2687-2697, 2010.
- LILICO, S.; VASEY, D.; KING, T. et al. Lentiviral transgenesis in livestock. **Transgenic Research**, v. 3, p. 441-442, 2011.
- MAGA, E.A.; CULLOR, J.S.; SMITH, W. et al. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, p. 384-392, 2006a.
- MAGA, E.A.; SHOEMAKER, C.F.; ROWE, J.D. et al. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 2, p. 518-524, 2006b.
- NANDI, S.; MUTHUCHELVAN, D.; AHUJA, A. et al. Prevalence of classical swine fever virus in India: a 6-year study (2004-2010). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, p. 461-463, 2011.
- PEREIRA, M.M.; BRANDÃO, H.M.; CARVALHO, B.C. et al. Identification of the presence of carbon nanotubes in bovine embryo by Raman spectroscopy. In: NANOAGRI, 1., 2010, São Pedro. **Anais...São Carlos: Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies**, 2010, p. 248-248.
- PEREIRA, M.M.; BARBOSA, N.R.; CAMARGO, L.S.A. et al. Transfecção gênica em fibroblastos bovinos utilizando nanotubos de carbono multicamadas. In: Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 6., 2012, Fortaleza. **Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação**, 2012. p. 431-433.
- PEREYRA-BONNET, F.; GIBBONS, A.; CUETO, M. et al. Efficiency of sperm-mediated gene transfer in the ovine by laparoscopic insemination, in vitro fertilization and ICSI. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, p. 188-196, 2011.



- POWELL, A.M.; TALBOT, N.C.; WELLS, K.D. et al. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 210-216, 2004.
- PURSEL, V.G.; PINKERT, C.A.; MILLER, K.F. et al. Genetic engineering of livestock. **Science**, v. 244, p. 1281-1288, 1989.
- SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 320-326, 2004.
- SALAMONE, D.; BARAÑAO, L.; SANTOS, C. et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 469-472, 2006.
- SANGALLI, J.R.; DE BEM, T.H.; PERECIN, F. et al. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. **Cellular Reprogramming**, v. 3, p. 235-247, 2012.
- SCHARFEN, E.C.; MILLS, D.A.; MAGA, E.A. Use of human lysozyme transgenic goat milk in cheese making: effects on lactic acid bacteria performance. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4084-4091, 2007.
- SINGER, O.; VERMA, I.M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. **Current Gene Therapy**, v. 6, p. 483-488, 2008.
- SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: mechanisms and implications. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 65, p. 459-467, 2007.
- SPADAFORA, C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. **Human Reproduction**, v. 23, p. 735-740, 2008.
- STEGEMAN, A.; ELBERS, A.; DE SMIT, H. et al. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p. 183-196, 2000.
- TOLEDO, J.R.; SÁNCHEZ, O.; MONTESINO, R. et al. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 370-376, 2008.
- UMEYAMA, K., SAITO, H.; KUROME, M. et al. Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 218-228, 2012.



- VAN HEKKEN, D.L.; WALL, R.J.; SOMKUTI, G.A. et al. Fate of lysostaphin in milk from individual cows through pasteurization and cheesemaking. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 444-457, 2009.
- WALL, R.J.; KERR, D.E.; BONDIOLI, K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2213-2224, 1997.
- WALL, R.J. Pronuclear microinjection. **Cloning Stem Cells**, v. 3, p. 209-220, 2001.
- WALL, R.J.; POWELL, A.M.; PAAPE, M.J. et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**, v. 4, p. 445-451, 2005.
- WHITELAW, C.B.; LILLICO, S.G.; KING, T. Production of transgenic farm animals by viral vector-mediated gene transfer. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 355-358, 2008.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.
- ZHAO, Y.; YU, M.; WANG, L. et al. Spontaneous uptake of exogenous DNA by goat spermatozoa and selection of donor bucks for sperm-mediated gene transfer. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 2659-2664, 2012.